

現生人類（新人：ホモサピエンス）の移動は約13万年前のアフリカ起源説に始まり、北上してヨーロッパ大陸に到達したものの、中東を経由してユーラシア大陸へ至り、東端の日本へ到達した者達がいる。わが国は島国であり、大陸から少人数が渡り住んだ結果、大陸の民族の一部が増幅した可能性を推察した過去がある。ガラパゴス諸島に代表されるような離島環境は生物学的にbottle neck effect（瓶の首効果）あるいはfounder effect（創始者効果）と称され、稀少生物の繁殖に適した環境とも考えられている。薬剤性肺障害の頻度を論じる場合に日本人が高頻度であることを考え

るには都合が良い、しかし、

近年、mtDNA（ミトコンドリアDNA）の解析から日本人の母系祖先が複数かつ多様であることが示唆されている。D4 36%を最大のハプログループに15種類以上に及ぶハプログループが混在する（図1：比率円グラフ）⁶⁾。日本人の母系遺伝子は決して少数の背景ではない。わが国の遺伝背景を比較すると、世界中と比べても、決して稀少なハプログループに偏っているとは言い難い。また、複数のハプログループは系統樹の視点から、近縁とは限らず、時間的、空間的に遠く離れた母系ハ

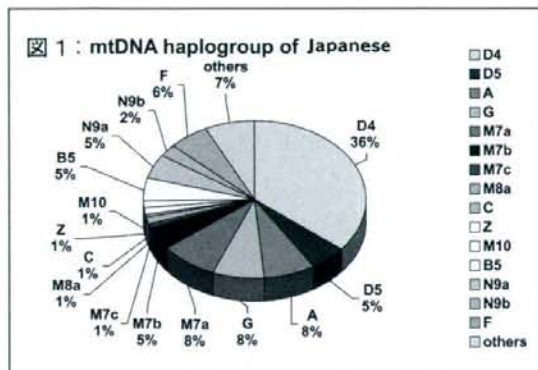


図1：日本人のミトコンドリアDNAハプログループ頻度。15種類以上はハプログループが確認されている。

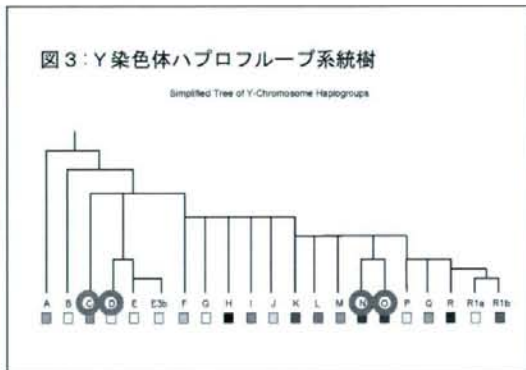


図3：Y染色体ハプログループ系統樹。D, C, N, Oハプログループが日本で確認されており、系統樹の上では決して近縁ではないグループが流入している。

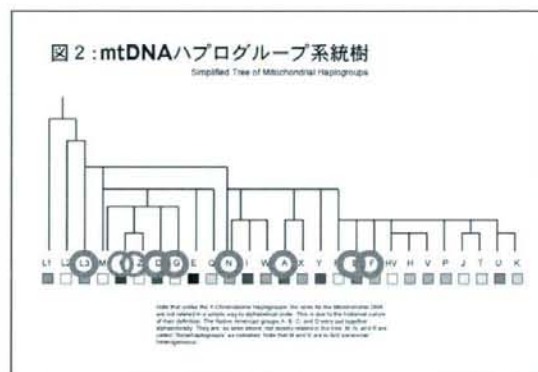


図2：mtDNAハプログループ系統樹。mtDNAの亜系は15種類以上になる。日本全国の頻度分布に偏りはない。

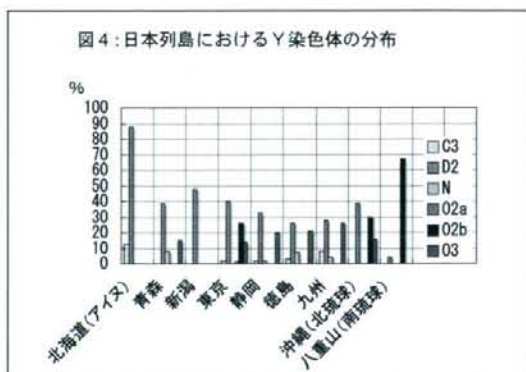


図4：日本列島におけるY染色体の分布。D2は来たに多く、O2b, O3は南に多く分布する傾向がある。

プログループから日本へ到達した人類が認められている図2：mtDNA系統樹）。

また、Y chromosome（Y染色体）の解析から父系起源についても、多様性が確認されており図3：Y染色体系統樹）、特にハプロタイプC、D、O、Nが高率に認められる。

地理的変遷の考察

最終氷河期（ヴユルム氷河期）の最後に海面が約200m上昇し、日本列島が大陸から隔離された時期は、約2万から1万5千年前とされている。一方、mtDNA研究の成果から人類の移動がアジア東端に到達した時期は約3から4万年前とされている⁶⁾。日本列島の隔離以前に人類は現在の日本列島の位置に陸路で到達していたと理解される。離島環境下でのbottle neck effectではなく、すでにあるハプログループの存在が複数、日本の位置に存在していた可能性が示唆される。例えば、後期旧石器時代のシベリア起源とする北方系移動性狩猟採集文化（石刃文化、細石刃文化など）は2万年より以前に日本の位置で繁栄しており、Y chromosome 情報を経時的に追跡すると、Q、C3がすでに存在していた。しかし、日本列島の成立以降も縄文文化草創期の担い手としてD2が、縄文時代早期の担い手としてC1、Nが、金属器時代に至るとO2、O3が日本列島へ流入してきた形跡が確認されている。いわゆる「渡来人」は農耕文明を携えて移住してきた形跡がある表3）。現代日本人のY chromosome 分布を見ると、D2は北に多く、O2、O3は南に多い傾向がある図4）⁷⁾。しかし、mtDNAハプログループの分布は日本全土で差が認められず、母系と父系の移動には大きな開きが認められる⁸⁾。こうしたmtDNAやY chromosomeハプログループ頻度分布の差がどのように疾患頻度分布に影響を与えているかは不明である。

D. 考察

mtDNAでは男でも女でも母系列のみが反映する。Y chromosomeでは父系列が反映するが、男の遺伝子解析しか可能ではなく、女性の父系がどこから来ているか、定かではない。近接の祖先が何人か？ということは別として、自分のルーツがどこから来たかをうかがい知ることができる。しかし、疾患を規定するあるいは関連する遺伝子は相同染色体上に座しているものと考えられるため、母系によって継承された感受性遺伝子は特定のmtDNAハプログループに集積する可能性はあるが、Y chromosomeは同一染色体上にある遺伝子は直接関与する場合を除いて、疾患との関連を解説することは困難と考える。

現在述べられることは、日本人の祖先がけっして稀少民族の末裔として繁栄したのではなく、時間を越えて、空間的に隔たった地域から極東の日本列島に移り住んできて現在に至っているということである。薬剤性肺障害の頻度やIPFの急性増悪に代表されるような「肺の脆弱性」は稀少な民族の拡大というよりは、これまでの日本列島が脆弱性の淘汰がなされない環境であった、と考えることはできないだろうか。

史実をひもといては、大陸では種族間抗争の結果、抹殺されるか辺境地へ追いやられた種族があったが、わが国の多様な種族はハプログループの数を見ても、「共存」を営んできた民族であることが示唆される。また、自然環境を考えても感染症などの疫病による淘汰が大陸に比べて著しくなかった可能性を、検証することが必要である。

グローバル時代に至り、自然環境、民族文化の異なる地域との交流にさらされている現在、薬剤性肺障害の頻度差は日本人が肺の脆弱性を高頻度を持つ民族であることを疑わせる。

一方、有害事象の取り扱いも著しく敏感な国民

である可能性を想起する。すなわち、リスク回避の敏感な民族が繁栄した結果、現在の日本人を形成している可能性である。このことは医薬品のみならず、食の安全、大気環境の安全などあらゆる分野にうかがい知ることができる。また、それを巧妙に実現してきた人種でもある。ただし、ワクチン接種の事例のようにリスク回避の信念が裏目に出た場合も少なくはない。

これらのことを踏まえて、1) 日本人の薬剤性肺障害の実態を追跡し、国際比較する。2) 対処法の開発につなげること。3) グローバル時代に諸外国との間にとるべき姿勢を模索すること。これらのことは、PMSとして国内は始められているが、同一の調査が諸外国でも実施されることの必要性をグローバル製薬企業に義務づけるなど、今後、国際基準の制定が必要であり、発展すべき課題である。

E. 結 論

- 1) 日本人の薬剤性肺障害の実態把握ならびに人類遺伝学的背景の考察から、「肺の脆弱性」が温存されてきた多様な民族である可能性が示唆された。
- 2) 薬剤性肺障害の国際比較を通して、日本人の本質を考察することが必要と考えられた。個人の視点からは脆弱性を守る方策が必要である。しかし、淘汰を免れてきた民族が肺障害の危機にさらされている近年、子孫のために対処すべき方策を模索することが、最も難題であると感じた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Azuma A. Invited Lecture “Ethnic difference of acute exacerbation of IPF” (9th World Association of Sarcoidosis and Other Granulomatous Disorders Meeting 2008 in Athens, Greece), 2008.6.21.

2. 学会発表

Azuma A., Hagiwara K, and Kudoh S: Basis of Acute Exacerbation of Idiopathic Pulmonary Fibrosis in Japanese Patients. *Am J Respir Crit Care Med* 177:1397-1398, 2008.

Azuma A., Usuki J. Novel therapy for idiopathic pulmonary fibrosis—How to evaluate the efficacy? *Respir Med CME* 1, 75-81, 2008

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

厚生労働科学研究費補助金
(医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業)
分担総合研究報告書

薬剤性肺障害の発現状況の国際比較に関する研究

“血清KL-6ならびにその亜分子モニタリングの
意義に関する研究”

石川 暢久 広島大学大学院医歯薬学総合研究科・分子内科学 助教
服部 登 広島大学大学院医歯薬学総合研究科・分子内科学 准教授
研究分担者 河野 修興 広島大学大学院医歯薬学総合研究科・分子内科学 教授

研究要旨

【背景】我々は間質性肺疾患の血清マーカーであるKL-6ならびにその亜分子は、急性呼吸窮迫症候群 (Acute respiratory distress syndrome: ARDS) や薬剤性肺障害の重症度や予後の指標になりうること、肺癌の腫瘍マーカーとしての性質も有することを報告してきた。【目的】Gefitinib治療を受けた非小細胞肺癌症例ならびにARDS症例で血清KL-6ならびにその亜分子値をモニタリングし、その測定意義を後ろ向きに検討すること。【方法】Gefitinib治療を受けた非小細胞肺癌79症例ならびにARDS 56症例を検討対象として、血清KL-6ならびにその亜分子値を治療前後でモニタリングした。【結果】Gefitinibによる薬剤性肺障害発症例 (6症例) の検討では、経過中血清KL-6値が上昇しなかった3症例は、治療に反応したが、KL-6が上昇した3症例は、Gefitinib投与中止ならびにステロイドパルス療法などの治療に抵抗性であった。Gefitinibによる薬剤性肺障害非発症例 (73症例) では、治療前血清KL-6値が高値を示す症例はGefitinib治療に対して反応性が乏しくかつ予後不良であった。治療開始後2週間でのKL-6の変化は、Gefitinib治療の反応性ならびに予後を早期に予測可能であることが明らかになった。治療前血清KL-6とEGFR遺伝子変異を検討しえた41症例中、25例にEGFR遺伝子変異を認めた。EGFR遺伝子変異を認める症例においては、血清KL-6値とProgression-free survival (PFS) ならびにOverall survival (OS) の相関を認めなかったが、EGFR遺伝子変異を認めない症例においては、血清KL-6値が高い患者群は、PFS ならびにOSともに有意に予後不良であった。ARDS症例における検討では、DIC合併群ではDIC非合併群と比較して、診断時血清KL-6値は高値を示す傾向を認め、多変量解析により、診断時血清KL-6値は独立したDIC合併の予測因子であった。【結論】Gefitinib投与開始前に、EGFR遺伝子変異検索と血清KL-6値測定を行うことにより、Gefitinib治療により、Gefitinibによる治療効果が得られる症例を選択できる可能性が示唆された。Gefitinib治療開始前後で血清KL-6値が上昇してくる症例は、Gefitinibによる致死的な薬剤性肺障害を発症している、あるいはGefitinib治療に対して反応性が乏しい可能性が高く、直ち

に高分解能胸部X線CT検査を行い、治療方針を決定することが重要と考えられた。ARDS症例において、ARDS診断時のみならず経時的にKL-6値をモニタリングすることでDICの合併を早期に予測できる可能性が示唆された。

A. 研究目的

薬剤の開発がグローバル化する中で、上皮成長因子受容体チロシンキナーゼ阻害剤 (epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors; EGFR-TKI)の臨床効果とその薬剤性肺障害の発生頻度に人種的な差異を認めることが明らかとなった。また、従来から欧米人と比較して日本人では特異性肺線維症の急性増悪と呼ばれるびまん性肺胞傷害 (Diffuse alveolar damage: DAD) の発症が多い事も指摘されているが、私達は間質性肺炎の存在そのものが薬剤性肺障害の真の危険因子というよりは、肺の線維化を起こしやすい遺伝形質を持つ日本人の中に薬剤性肺障害、特に致死的なDADパターンの肺障害を起こしやすいグループがいるのではないかと推定している。

KL-6は私達の発見した高分子量糖蛋白であり、ヒトMUC1ムチンにクラスター分類されるものであり、間質性肺炎に特異性の高い診断マーカーとして臨床応用されている。一方、KL-6は当初肺腺癌の組織マーカー、血清腫瘍マーカーとして開発された経緯もあり、肺癌の診断マーカーとしての性格も有している。現在までに血管内での血小板凝集にムチンが関与すること、ムチンの白血球や血小板への結合は細胞表面のセレクトインとムチン上のセレクトインリガンドを介してなされることが報告されている。さらに、これらムチン-セレクトイン相互作用はマウスにおいて血小板凝集を惹起することが報告されているが、この血小板凝集は、抗P-あるいは抗L-セレクトイン抗体で抑制可能であることから、その機序としてムチン上のセレクトインリガンドが関与しているものと考えられ

る。MUC1ムチンは巨大分子であり、その分子上には種々のエピトープが存在すると想定され、我々も実際にそのようないくつかのKL-6亜分子を見出している。以上より、私達はセレクトインリガンドをもつMUC1が存在する可能性が高いと考え検討を行った結果、少なくともシアリルルイスaを有するKL-6亜分子 (CA19-9抗体とKL-6抗体でサンドイッチされる分子: SLAKと命名)を測定することが出来た。次に、SLAKの肺癌の進展・予後マーカーとしての有用性を検討すると、SLAKは肺腺癌特異性を高めたKL-6の亜分子であり、血清中SLAK値は、肺腺癌患者の予後の予測因子として有用であることがわかった。

以上の背景より、本研究では薬剤性肺障害を惹起しやすいGefitinibの使用前後において、血清KL-6値の測定意義を明らかにすることを目指したい。薬剤性肺障害を高頻度に来すとされているGefitinibなどの薬剤においてもその発症頻度は投与例の約4%程度であり、短期間に薬剤性肺障害の症例を集積することは困難である。そこで、致死性薬剤性肺障害と類似する病態を呈すると考えられる急性呼吸窮迫症候群 (Acute respiratory distress syndrome: ARDS) 患者におけるKL-6ならびにその亜分子のモニタリングの意義を検討することによって、薬剤性肺障害の病態の解明に迫りたい。

B. 研究方法

- 1) Gefitinib投与症例における血清KL-6ならびにその亜分子のモニタリングの有用性に関する検討

病理学的に非小細胞肺癌と診断され、広島大学病院ならびに愛媛大学病院でGefitinib治療を受けかつ患者本人から文書で同意が得られた症例を対象とした。具体的には、以下の基準（臨床病期：III B期、IV期または術後再発、前治療として、化学療法を1レジメン以上施行、年齢：20歳以上、上限なし、PS(ECOG)：0-3、測定可能病変を有する、主要臓器機能が保たれている）を満たした77症例に、他院でGefitinibの投与が開始され、Gefitinibによる薬剤性肺障害が発症した後に広島大学病院に転院した2症例も検討に加え、計79症例を検討対象とした。

治療前後で経時的に血清を採取し、遠心分離した後、-80℃で凍結保存し、その後、血清KL-6値、SLAK値、CEA値、CYFRA値を測定し、その臨床的意義について検討を行った。さらに41症例のホルマリン固定後の肺癌組織を入手し、EGFR遺伝子変異の有無についてPNA-LNA PCR clamp法を用いて検討した。剖検時に採取された薬剤性肺障害組織におけるKL-6の発現を免疫組織染色により検討した。

2) KL-6のモニタリングによるARDSにおける予後ならびにDICの予測

広島大学病院に入院し、

ARDSと診断され、患者本人またその代読者から文章で同意が得られた53症例（男性36症例、女性20症例、年齢65.8±14.5歳）を対象にした。

診断時の血清中KL-6、値ならびに凝固能を測定し、DIC score、肺損傷スコア、APACHE IIスコアを同時に算出した。診断時及び経

時的に血清中KL-6値ならびに凝固能をモニタリングし、経過中DICを合併したものはDIC合併群とした。生存者は最低60日間以上の経過観察を行った。KL-6と予後、DICを含めた臨床病理学的因子の関係について検討した。

（倫理面への配慮）

本研究の対象者は、ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針（平成13年3月29日文部省・厚生労働省・経済産業省告示第1号）に沿って作製され、当院のヒトゲノム研究倫理審査研究会で承認された文書によるインフォームド・コンセントが得られた症例とした。患者のプライバシーを厳守して研究を実施している。

C. 研究結果

1) 薬剤性肺障害発症例におけるKL-6モニタリングの意義

Gefitinibによる薬剤性肺障害が発症した6症例におけるKL-6値をモニタリングし、臨床的意義について検討を行った。経過中血清KL-6値が上昇しなかった3症例は、治療に反応し薬剤性肺障害は改善した。一方で、KL-6が経過中に上昇した3症例は、胸部CT上は急性間質性肺炎パターン

表1. Gefitinibによる治療効果と患者背景の関連

Variables	Total n=73	PR n=26	SD n=10	PD n=37	P-value (PR vs SD + PD)	P-value (PR vs SD + PD)
Age (Years)					0.139	>0.999
<60	32	8	4	20		
≥60	41	18	6	17		
Gender					0.001*	<0.001*
Male	42	8	5	29		
Female	31	18	5	8		
Histologic type					0.356	>0.999
Ad	60	23	7	30		
Non-Ad	13	3	3	7		
Disease stage					0.085	0.515
III B	8	1	3	4		
IV	48	18	3	27		
Recurrence	17	7	4	6		
Performance status					0.266	0.025*
<2	56	22	10	24		
≥2	17	4	0	13		
Smoking history					0.001*	<0.001*
Never	33	19	5	9		
Smoker	40	7	5	28		
Number of prior chemotherapy regimens					0.128	0.087
<2	47	20	7	20		
≥2	26	6	3	17		
Serum CEA level		14.5	5.75	14.65	0.376	0.683
Medium						
Range		1.2- 726.9	0.5- 115.5	0.9- 1536.5		
Serum KL-6 level		380.5	273	746	0.167	0.015*
Medium						
Range		186- 4201	195- 9475	155- 8300		
Serum SLAK level		62.2	20	43.2	0.364	0.591
Medium						
Range		<20- 1637.8	<20- 13493.3	<20- 11532.6		

Ad : adenocarcinoma

*P < 0.05

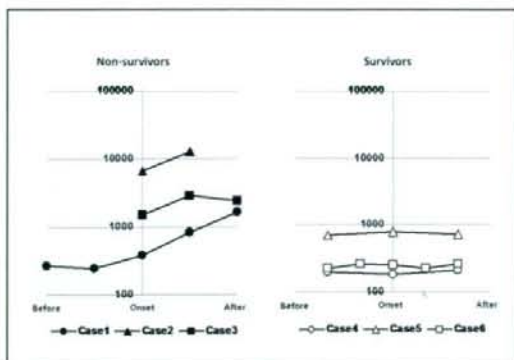


図1. 薬剤性肺障害発症例（6症例）における血清KL-6値の推移

経過中血清KL-6値が上昇しなかった3症例は、治療に反応したが、KL-6が上昇した3症例は、Gefitinib投与中止ならびにステロイドパルス療法などの治療に抵抗性であった。

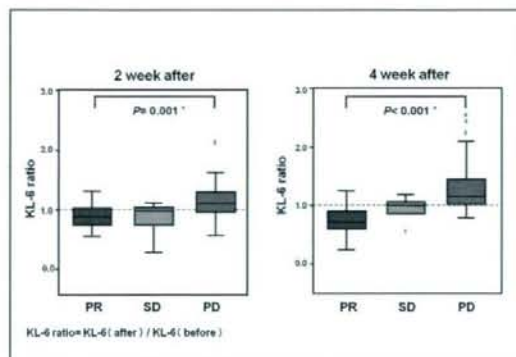


図3. 薬剤性肺障害非発症例（73症例）における血清KL-6値の推移

Gefitinib治療開始後のKL-6の変化は、治療効果を早期に予測する可能性が示唆される。

に分類され、Gefitinib投与中止ならびにステロイドパルス療法などの治療に反応せずに死亡した（図1）。死後3症例すべてに剖検が行われたが、新旧のDADが混在するという従来Gefitinibによる薬剤性肺障害に合致する所見であった。新旧のDAD組織を抗KL-6抗体によって組織免疫染色を施行したところ、器質化しつつある古いDAD組織と比較して、新しいDAD組織で上皮細胞においてKL-6糖タンパクが強く染色された。

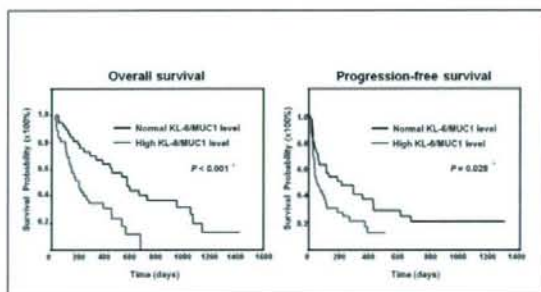


図2. Gefitinib治療前の血清KL-6値と生存期間の相関
Gefitinib治療前血清KL-6値が高い患者群は、Overall survival(OS)ならびにProgression-free survival (PFS)ともに有意に予後不良であった。

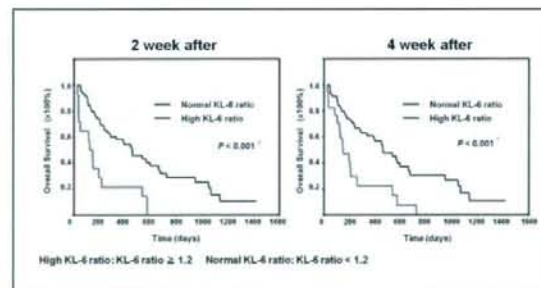


図4. Gefitinib治療前後の血清KL-6値の変化と生存期間の相関

Gefitinib治療開始2週後、4週後も、KL-6 ratio（治療前後の比）が1.2未満の症例では、ゲフィチニブによる生存期間の延長が期待されることがわかった

2) 薬剤性肺障害非発症例におけるKL-6モニタリングの意義

Gefitinibが投与され、経過中に薬剤性肺障害を発症しなかった73症例について、血清KL-6値ならびにSLAK値モニタリングの意義について検討した。患者背景と治療前の血清KL-6値はいずれの臨床病理学的因子とも相関を認めなかった。治療効果に関与する臨床病理学的因子としては、これまで報告されている性別、喫煙歴、PSなどのほかに、治療前の血清KL-6値が高い患者群

表 2 a. Gefitinib治療における予後規定因子の検討—overall survival—

Variables	Odds ratio	95% Confidence interval		Unfavorable/Favorable	P-value
		Lower	Upper		
Univariate analysis					
Age (years)	1.112	0.636	1.946	60 ≤ / <60	0.709
Sex	1.805	1.030	3.162	Male / Female	0.039*
Histology	1.557	0.814	2.977	Non-Ad / Ad	0.180
Stage	1.113	0.521	2.376	Other / I/II	0.782
Performance status	6.666	2.307	13.435	2/0 / ≥1	<0.001*
Smoking history	1.553	0.895	2.695	Smoker / Never	0.117
No. of prior chemotherapy regimens	1.010	0.582	1.751	2/0 / ≥1	0.972
Serum KL-6 level	2.924	1.607	5.322	High / Normal	<0.001*
Serum CEA level	1.209	0.689	2.121	High / Normal	0.509
Serum CYFRA21-1 level	1.354	0.742	2.472	High / Normal	0.324
Multivariate analysis					
Sex	1.469	0.819	2.632	Male / Female	0.197
Performance status	7.265	3.589	14.706	2/0 / ≥1	<0.001*
Serum KL-6 level	3.134	1.723	5.701	High / Normal	<0.001*

表 2 b. Gefitinib治療における予後規定因子の検討—progression-free survival—

Variables	Odds ratio	95% Confidence interval		Unfavorable/Favorable	P-value
		Lower	Upper		
Univariate analysis					
Age (years)	0.991	0.547	1.661	60 ≤ / >60	0.797
Sex	2.422	1.402	4.641	Male / Female	0.001*
Histology	1.712	0.887	3.303	Non-Ad / Ad	0.106
Stage	0.733	0.343	1.604	Other / I/II	0.422
Performance status	5.415	1.796	14.490	2/0 / ≥1	0.002*
Smoking history	2.303	1.115	4.931	Smoker / Never	0.004*
No. of prior chemotherapy regimens	1.407	0.811	2.411	2/0 / ≥1	0.224
Serum KL-6 level	1.842	1.039	3.280	High / Normal	0.031*
Serum CEA level	1.128	0.647	1.963	High / Normal	0.671
Serum CYFRA21-1 level	1.208	0.698	2.112	High / Normal	0.438
Multivariate analysis					
Sex	1.319	0.798	2.141	Male / Female	0.283
Performance status	2.373	1.285	4.432	2/0 / ≥1	0.007*
Smoking history	2.412	1.272	4.581	Smoker / Never	0.002*
Serum KL-6 level	2.008	1.118	3.602	High / Normal	0.014*

表 3. ARDS診断時の患者背景

Characteristic	ARDS (n = 56)		P-value
	without DIC (n = 38)	with DIC (n = 18)	
Gender (male/female)	24/14	12/6	1.000
Age (years)	67.0 ± 11.8	63.3 ± 19.2	0.765
KL-6 (U / mL)	376 ± 328	601 ± 563	0.018
D-dimer (μg / mL)	11.3 ± 13.0	19.7 ± 15.2	0.010*
LDH (IU / mL)	362 ± 167	473 ± 273	0.138
CRP (mg / dL)	15.1 ± 9.3	14.1 ± 8.9	0.636
Platelet counts (×10 ⁹ / L)	187 ± 95	106 ± 65	0.001*
PaO ₂ /Fio ₂ ratio	143.7 ± 30.6	146.4 ± 32.3	0.806
Arterial pH	7.39 ± 0.12	7.40 ± 0.07	0.352
Peak airway pressure (cm H ₂ O)	21.4 ± 5.2	22.2 ± 5.0	0.755
Mean airway pressure (cm H ₂ O)	14.0 ± 3.4	14.7 ± 2.9	0.602
PEEP (cm H ₂ O)	6.5 ± 2.4	7.1 ± 2.2	0.479
Lung Injury score	2.30 ± 0.44	2.55 ± 0.58	0.116
APACHE II score	17.9 ± 6.0	18.9 ± 5.3	0.660
SOFA score	6.2 ± 2.6	7.7 ± 2.3	0.053
SIRS criteria	2.7 ± 0.8	2.4 ± 1.0	0.214
DIC score	3.2 ± 1.5	4.9 ± 1.4	≤0.00*
Cause of ARDS (direct/indirect)	27/11	12/6	0.763

ARDS, acute respiratory distress syndrome; DIC, disseminated intravascular coagulation; LDH, lactate dehydrogenase; CRP, C-reactive protein; Fio₂, fraction of inspired oxygen; PEEP, positive end-expiratory pressure levels; APACHE, Acute Physiology and Chronic Health Evaluation; SOFA, Sequential Organ Failure Assessment; SIRS, systemic inflammatory response syndrome.

*P < 0.05

では、Gefitinib治療に対して反応性が乏しく、かつ予後不良であった(表3), Gefitinib治療前の血清KL-6値が高い患者群は、Progression-free survival (PFS)ならびOverall survival (OS)ともに有意に予後不良であり(図2), 独立した予後不良因子であった

(表2), 血清SLAK値, CEA値, CYFRA値については, 生存期間に有意差を認めなかった。

Gefitinib治療開始前後での血清KL-6値の変化と治療効果について検討した。Gefitinib治療前と治療開始後2週および4週後に血清KL-6値を測定し, 治療開始後のKL-6値の増加は, 進行(progressive disease; PD)患者群で有意に大きいことがわかった(図3)。次に治療前後の血清KL-6値の変化と予後について検討したところ, 2週後, 4週後とも, KL-6 ratio (治療前後の比)が1.2未満の症例では, Gefitinibによる生存期間の延長が期待されることがわかった(図4)。

EGFR遺伝子変異を検討しえた41症例中, 25例にEGFR遺伝子変異を認め, 変異のある症例では, PFSの延長を認めたが, OSの延長を認めなかった。さらに, EGFR遺伝子変異を認める症例においては, 血清KL-6値とPFSならびにOSの相関を認めなかったが, EGFR遺伝子変異を認めない症例においては, 血清KL-6値が高い患者群は, PFSならびにOSともに有意に予後不良であった(図5)。

3) KL-6のモニタリングによるARDSにおける予後ならびにDICの予測

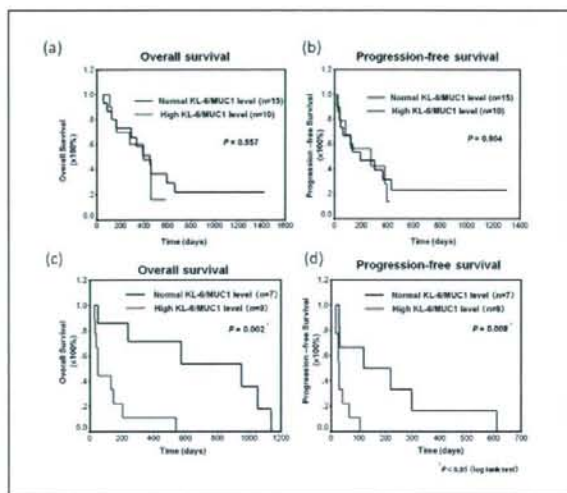


図5. Gefitinib治療前の血清KL-6値と生存期間の相関：EGFR遺伝子変異によるサブグループ解析

EGFR遺伝子変異を認める症例においては、Gefitinib治療前血清KL-6値とOS(a)ならびにPFS(b)の相関を認めなかったが、EGFR遺伝子変異を認めない症例においては、Gefitinib治療前血清KL-6値が高い患者群は、OS(c)ならびにPFS(d)ともに有意に予後不良であった。

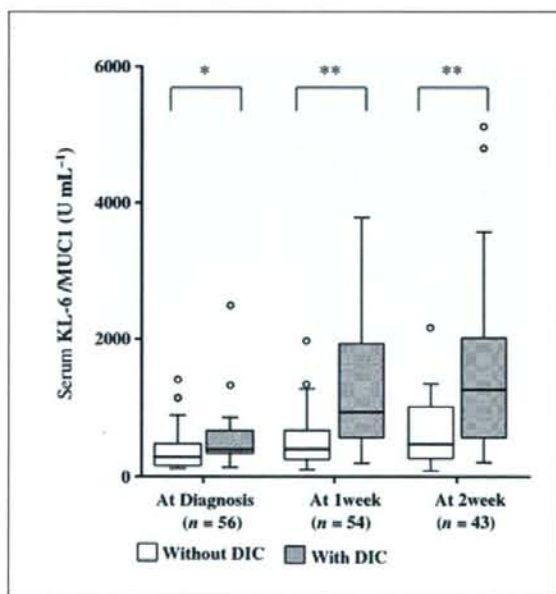


図6. ARDS症例における血清KL-6値の推移

血清KL-6値をモニタリングしたところ、診断1週後及び2週後で、DIC合併群とDIC非合併群の差はさらに顕著になった。

解析した56症例中、発症原因となる基礎疾患は、肺炎などの直接損傷が39症例、敗血症などの間接損傷が17症例であった。DIC合併群と非合併群の背景因子を検討したところ、ARDS診断時の血清KL-6値、D-dimer値、血小板値、DICスコアは2群間で有意差を認めたが、PaO₂/FiO₂比、肺損傷スコア、CRP値、SIRSの診断基準、APACHI IIスコア、SOFAスコア、人工呼吸器の設定には有意差を認めなかった(表3)。DIC合併群は44%しか生存しなかったのに対して、DIC合併群は90%が生じた。また、ARDS診断時血清KL-6値は、DIC合併群ではDIC非合併群と比較して、高値を示す傾向を認め(601±563 U/ml vs 376±328 U/ml; P=0.018)、死亡群では生存群と比較して、高値を示す傾向を認めた(621±522 U/ml vs 287±219 U/ml; P<0.001)。

血清KL-6値をモニタリングしたところ、診断1週後及び2週後で、DIC合併群とDIC非合併群の差はさらに顕著になった(図6)。また、多変量解析により、ARDS診断時血清KL-6値ならびに血小板数は独立したDIC合併の予測因子であった(表4)。診断時血清KL-6値とDICスコアの増加は相関した。

ARDS診断時血清KL-6値による将来のDIC合併予測の可能性について検討したところ、感度88.9%、特異度55.3%であった。なお、カットオフ値はROC曲線を用いて、300U/mlに設定した。ARDS診断時血清KL-6値が高値を認める症例は、経過中に33症例中16症例(48%)がDICを合併したのに対して、そうでない症例は23症例中2症例(9%)がDICを合併したのみであった(図7)。

表4. ARDS患者におけるDIC合併の予測

Variables	Odds ratio	95% Confidence interval		P-value
		Lower	Upper	
Gender (male/female)	2.176	0.426	11.197	0.350
Age (Years)	0.975	0.926	1.027	0.347
KL-6 (U/ml)	1.027	1.004	1.050	0.024
D-dimer ($\mu\text{g/ml}$)	0.996	0.944	1.051	0.877
Platelet counts (per $10^3/\text{L}$)	0.850	0.735	0.984	0.029
SOFA score	1.022	0.677	1.543	0.918

ARDS, acute respiratory distress syndrome; DIC, disseminated intravascular coagulation; SOFA, Sequential Organ Failure Assessment.

* $P < 0.05$

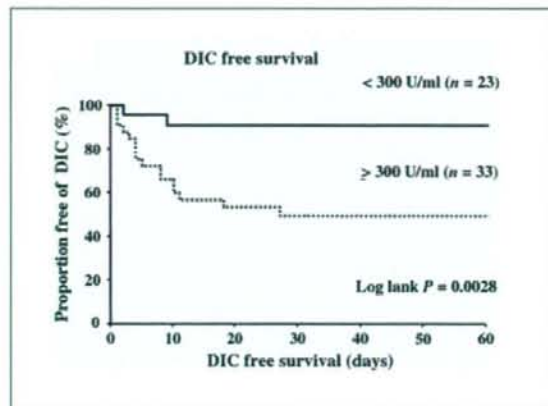


図7. 血清KL-6によるDIC合併予測の可能性

診断時血清KL-6値が高値を認める症例は、経過中に33症例中16症例(48%)がDICを合併したのに対して、そうでない症例は23症例中2症例(9%)がDICを合併したのみであった。

D. 考察

少数例(6症例)での検討ではあるが、血清KL-6値はGefitinibによる薬剤性肺障害、特に致死性肺障害であるDiffuse Alveolar Damage(DAD)を来す症例で上昇する可能性が示唆された。この結果は、KL-6は薬剤性肺障害の中でも、最も予後の悪いとされているDADパターンを呈する薬剤性肺障害とステロイド治療に反応する薬剤性肺障害の鑑別に有用であるとする示唆する私達の報告を裏づけるものと思われる。剖検症例を用いた免疫組織学的検討では、KL-6タンパクは新旧のDADの中でも特に新しいDADで発現が強いことがわかった。

Gefitinibによる薬剤性肺障害を発生しなかった73症例の検討では、Gefitinib治療前血清KL-6値が高値を示す症例はGefitinib治療に対して反応性が乏しくかつ予後不良であることがわかった。さらに、Gefitinibによる治療開始後2週間でのKL-6の変化は、Gefitinib治療の反応性ならびに予後を早期に予測可能であることがわかった。一方で、肺腺癌特異性を高めたKL-6の重分子である血清中SLAK値は、Gefitinibに対する耐性機序と全く相関を認めなかった。現在までにKL-6がクラスター分類されるMUC1はEGFRと結合すること、MUC1の発現がEGFR依存性のシグナル伝達を促進することがわかっている。KL-6がGefitinibの治療の耐性あるいは抵抗性に関係することを示唆する今回の結果は、EGFRリガンド(amphiregulin, TGF- α など)の質的変化がGefitinibの耐性機序にかかわることを示唆する私達の報告を裏づけるものと思われる。

EGFR遺伝子変異によるサブグループ解析を行ったところ、EGFR遺伝子変異を認めない症例(Wild type)では、血清KL-6と予後が相関したのに対して、EGFR遺伝子変異を認める症例では、全く相関を認めないことが分かった。EGFR遺伝子変異は、Gefitinib治療に対して部分奏効(partial response; PR)患者群を予測するのに有用であるとされているが、腫瘍部から直接組織を採取することが必要であり、多くの患者においては検査に必要な最低限の量の腫瘍組織の採取が難しい、検査に時間、労力、費用がかかるなどの理由でGefitinib治療の決定に汎用されているとは言えないのが現状である。一方で、血清KL-6値の測定は、低侵襲、低コストの迅速検査であり、汎用性があると思われる。従来、Gefitinib治療前血清KL-6値が高値を示す症例の中にもGefitinibに対する劇的な治療効果を認める症例が存在する

ことが指摘されていたが、今回の検討結果よりEGFR遺伝子変異を認める症例については、血清KL-6値に関わらずGefitinibの治療適応となる可能性が示唆された。一方で、昨今EGFR遺伝子変異を認めない症例ではGefitinibの投与が敬遠される傾向があるが、このような症例の中にも血清KL-6値が低値を示す症例ではGefitinibによる治療効果が得られる可能性が考えられ、臨床上重要であると思われる。

また、治療前血清KL-6値が高い症例は、すべての化学療法に抵抗性である可能性が考えられるが、私達は今回の検討と同時期にGefitinib治療が行われなかったIIIB、IV期非小細胞肺癌症例の診断時血清KL-6値と予後との関係について検討したが、優位な相関を認めなかった。その詳細なメカニズムについては今後の検討課題であるが、KL-6分子がGefitinib治療の耐性あるいは抵抗性に関係しているのではないかと考えている。

では、KL-6は一体、どこで産生されているかという疑問が生じてくる。そこで、私達は外科的治療切除を受けた非小細胞肺癌患者25名の治療前後のペア血清で血清KL-6値を検討し、いずれの症例においても原発巣の切除に伴い、血清KL-6値が低下することを確認した。また、非小細胞肺癌原発巣の免疫組織染色では、原発巣でKL-6糖タンパクの発現を認め、その発現パターンと血清中のKL-6値が相関することを確認した。

以上より、非小細胞肺癌患者において、薬剤性肺障害、特にDADを発症した際には、腫瘍ならびに間質性肺炎のいずれにおいてもKL-6を産生している可能性が考えられる。今後は、中国・四国地方の4大学（広島大学・島根大学・愛媛大学・高知大学）を中心とした血清KL-6値モニタリングとEGFR遺伝子変異検査を組み合わせた前向き試験を行い、強いエビデンスを作る必要があると思われる。また、本研究とは別途に行っている

“間質性肺炎・薬剤性肺障害の臨床像とゲノム解析の日欧比較研究”において、間質性肺炎・薬剤性肺障害の人種的な差異を規定すると考えられる分子を同定しており、これらの分子も検証する予定である。

ARDS症例において、発症時のみならず経時的にKL-6値をモニタリングすることでDICの合併を早期に予測できる可能性が示唆された。凝固異常と炎症は密接に関係していることから、ARDSにおけるDICの合併は、ARDSの病態増悪につながると考えられる。DICの診断基準を満たさないARDS症例でもその約半分に血小板の減少が経過中に認められ、DICの有無にかかわらず多数の症例において剖検により肺に微小血栓が認められることが報告されている。血清KL-6値のモニタリングにより、早期にDIC合併を予測することが可能になれば、ARDSの治療成績が改善するものと思われる。今後は、ARDS症例における血清SLAK値モニタリングの意義やマイクロサンプリングプローブを用いた肺胞被覆液中KL-6ならびにその重分子値の検討を行い、ARDSの病態進展のメカニズムを解明したい。

E. 結 論

Gefitinib投与開始前に、EGFR遺伝子変異検索と血清KL-6値測定を行うことにより、Gefitinib治療により、Gefitinibによる治療効果が得られる症例を選択できる可能性が示唆された。

Gefitinib治療開始前後で血清KL-6値が上昇してくる症例は、Gefitinibによる致命的な薬剤性肺障害を発症している、あるいはGefitinib治療に対して反応性が乏しい可能性が高く、直ちに高分解能胸部X線CT検査を行い、治療方針を決定することが重要と考えられた。

F. 健康危険情報

なし.

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Nakashima T, Yokoyama A, Onari Y, Shoda H, Haruta Y, Hattori N, Naka T, Kohno N. Suppressor of cytokine signaling 1 inhibits pulmonary inflammation and fibrosis. *J Allergy Clin Immunol* 121:1269-76, 2008.
- 2) Ishikawa N, Hattori N, Yokoyama A, Tanaka S, Nishino R, Yoshioka K, Ohshimo S, Fujitaka K, Ohnishi H, Hamada H, Arihiro K, Kohno N. Usefulness monitoring of circulating KL-6 in patients with advanced non-small cell lung cancers treated with gefitinib therapy. *Int J Cancer* 122:2612-20, 2008.
- 3) Nakashima T, Yokoyama A, Ohnishi H, Hamada H, Ishikawa N, Haruta Y, Hattori N, Tanigawa K, Kohno N. Circulating KL-6/MUC1 as an independent predictor for disseminated intravascular coagulation in acute respiratory distress syndrome. *J Intern Med* 263:432-9, 2008.
- 4) Inata J, Hattori N, Yokoyama A, Ohshimo S, Doi M, Ishikawa N, Hamada H, Kohno N. Circulating KL-6/MUC1 mucin carrying sialyl Lewis x oligosaccharide is an independent prognostic factor in patients with lung adenocarcinoma. *Int J Cancer* 120:2643-9, 2007.
- 5) Shoda H, Yokoyama A, Nishino R, Nakashima T, Ishikawa N, Haruta Y, Hattori N, Naka

T, Kohno N. Overproduction of collagen and diminished SOCS1 expression are causally linked in fibroblasts from idiopathic pulmonary fibrosis. *Biochem Biophys Res Commun* 353:1004-10, 2007.

- 6) 石川暢久, 河野修典. 間質性肺炎のマーカー・KL-6. *日本胸部臨床* 67: S26-30, 2008
 - 7) 服部登, 河野修典. 間質性肺炎の血清マーカー. *呼吸器科*: 297-302, 2008
 - 8) 服部登, 河野修典. バイオマーカーの有用性と問題点. *呼吸器科*14: 104-108, 2008.
 - 9) 石川暢久, 河野修典. 薬剤性肺障害. *リウマチ科*40: 363-370, 2008.
 - 10) 石川暢久, 河野修典. 腫瘍マーカーのバイオマーカーとしての臨床的意義. *医学のあゆみ「肺癌UPDATE」* 224: 1159-1163, 2008.
 - 11) 服部登, 河野修典. BALの臨床応用. 「気管支肺胞洗浄「BAL」の手引き」. 日本呼吸器学会, びまん性肺疾患学術部会. 克誠堂出版, 東京, 5-7, 2008.
 - 12) 河野修典, 久保恵嗣, 井上義一, 小山徹, 坂口文. 座談会 薬剤性肺障害をめぐる. *日本内科学会雑誌*96: 1168-86, 2007.
 - 13) 石川暢久, 河野修典. 誌上臨床講義 薬剤性肺障害について. *広島市内科医会報*60: 8-14, 2007.
 - 14) 石川暢久, 河野修典. 医原性肺疾患. 「呼吸ケアのための呼吸器疾患事典」. 編著: 安間文彦. メディカ出版, 大阪, 196-203, 2007.
- ### 2. 学会発表
- 1) 吉岡宏治, 石川暢久, 友田義崇, 金原正志, 風呂中誠, 稲田順也, 藤高一慶, 春田吉則, 村井博, 服部登, 河野修典. Gefitinib 治療を受けた非小細胞肺癌患者における血清KL-6値及びsialyl Lewis xを発現したKL-6値の検

- 討. 第49回日本肺癌学会総会, 2008年11月, 北九州.
- 2) 田中惣之輔, 石川暢久, 妹尾直, 長尾早江子, 藤高一慶, 春田吉則, 村井博, 服部登, 河野修興. 75歳以上の進行非小細胞肺癌の検討. 第49回日本肺癌学会総会, 2008年11月, 北九州.
 - 3) 田中惣之輔, 石川暢久, 吉岡宏治, 藤高一慶, 服部登, 河野修興. 肺癌の血清バイオマーカー, 治療標的としてのKL-6/MUC1. 第67回日本癌学会総会, 2007年10月, 名古屋市.
 - 4) 吉岡宏治, 石川暢久, 田中惣之輔, 稲田順也, 藤高一慶, 服部登, 河野修興. EGFR-TKI治療を受けた非小細胞肺癌患者における血清KL-6およびsialyl Lewisxが発現したKL-6値の臨床的意義. 第67回日本癌学会総会, 2007年10月, 名古屋市.
 - 5) 河瀬成穂, 服部登, 峠岡康幸, 妹尾直, 谷本琢也, 風呂中誠, 石川暢久, 藤高一慶, 春田吉則, 河野修興. プレオマイシン肺線維症モデルに対するアンプロキシソールの抑制効果. 第48回日本呼吸器学会総会, 2008年6月, 神戸市.
 - 6) 妹尾直, 服部登, 谷本琢也, 風呂中誠, 石川暢久, 藤高一慶, 春田吉則, 峠岡康幸, 河野修興. プレオマイシン肺線維症モデルマウスにおける, RNA干渉を利用したPAI-1の発現抑制による抗線維化作用の検討. 第48回日本呼吸器学会総会, 2008年6月, 神戸市.
 - 7) 石川暢久, 服部登, 横山彰仁, 吉岡宏治, 田中惣之輔, 河瀬成穂, 藤高一慶, 濱田泰伸, 河野修興. Gefitinib使用患者における血清KL-6値モニタリングの意義. 第48回日本呼吸器学会総会, 2008年6月, 神戸市.
 - 8) Kohno N. Krebs von den Lungen-6 (KL-6) is a Serologic and Prognostic Biomarker and a Possible Therapeutic Target for IPF. The 48th Annual Meeting of the Japanese Respiratory Society. Kobe, 2008.
 - 9) Yoshioka K, Hattori N, Ishikawa N, Tanaka S, Akita S, Kawase S, Fujitaka K, Taooka Y, Haruta Y, Kohno N. The 48th Annual Meeting of the Japanese Respiratory Society. Kobe, 2008.
 - 10) 河瀬成穂, 服部登, 石川暢久, 秋田慎, 吉岡宏治, 田中惣之輔, 藤高一慶, 峠岡康幸, 有廣光司, 河野修興. Gefitinibによる薬剤性肺障害における血清KL-6値の有用性の検討. 第48回日本肺癌学会総会, 2007年11月, 名古屋.
 - 11) 吉岡宏治, 秋田慎, 河瀬成穂, 田中惣之輔, 石川暢久, 藤高一慶, 春田吉則, 峠岡康幸, 服部登, 河野修興. 血清KL-6値のモニタリングによってGefitinibによる治療効果ならびに予後を早期に予測可能である. 第48回日本肺癌学会総会, 2007年11月, 名古屋.
 - 12) 秋田慎, 服部登, 石川暢久, 田中惣之輔, 吉岡宏治, 河瀬成穂, 藤高一慶, 春田吉則, 峠岡康幸, 河野修興. 肺癌手術症例における血清KL-6値の予後マーカーとしての有用性の検討. 第48回日本肺癌学会総会, 2007年11月, 名古屋.
 - 13) Ishikawa N, Hattori N, Tanaka S, Taniwaki M, Nishino R, Fujitaka K, Taooka Y, Hamada H, Yokoyama A, Kohno N. Significance of Circulating KL-6/MUC1 as a Prognostic Factor in Node-negative Non-Small Cell Lung Cancer. 第66回日本癌学会総会, 2007年10月, 横浜市.
 - 14) 谷本琢也, 服部登, 妹尾直, 風呂中誠, 横山彰仁, 河野修興. ヘムオキシゲナーゼ-1 (HO-1) を高発現するBach-1ノックアウトマウ

スにおける高濃度酸素肺傷害の検討. 第47回
日本呼吸器学会総会, 2007年6月, 東京都.

- 15) 妹尾直, 服部登, 谷本琢也, 風呂中誠, 石川
暢久, 藤高一慶, 春田吉則, 峠岡康幸, 横山
彰仁, 河野修興. プレオマイシン肺線維症モ
デルにおける, RNA干渉を利用したPAI-1の
発現抑制による抗線維化作用の検討. 第47回
日本呼吸器学会総会, 2007年6月, 東京都.
- 16) Nakashima T, Yokoyama A, Inata J, Ishikawa
N, Haruta Y, Hattori N, Kohno N. KL-6/
MUC1 mucin with selectin ligands as a prognosis
predictor in patients with Acute Respiratory
Distress syndrome. 第47回日本呼吸器学会
総会, 2007年6月, 東京都.
- 17) Shoda H, Yokoyama A, Nishino R, Nakashima
T, Ishikawa N, Haruta Y, Hattori N, Naka
T, Kohno N. A causal relationship between
overproduction of collagen and the diminished
SOCS1 expression in fibroblasts from idiopathic
pulmonary fibrosis. 第47回日本呼吸器学会
総会, 2007年6月, 東京都.
- 18) Ishikawa N, Yokoyama A, Doi M, Tanaka
S, Kondo K, Ohnishi H, Hattori N, Kohno
N. Anti-tumor effect of the anti-KL-6/MUC1
monoclonal antibody. First JCA-AACR
Special Joint Conference. The Latest Advances
in Lung Cancer Research: From Basic Science
to Therapeutics. 2005, Nagoya.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし.
2. 実用新案登録
なし.
3. その他
なし.

厚生労働科学研究費補助金
医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業

薬剤性肺障害の発現状況の国際比較に関する研究
分担総合研究報告

薬剤性肺障害における遺伝子学的検討、HLAの解析

研究分担者 太田 正穂
信州大学医学部法医学教室 講師

研究要旨

薬剤服用により、喘息、間質性肺炎、好酸球性肺炎、肺水腫、胸膜炎など多様な肺病変を示す薬剤性肺障害は、使用する薬剤により人種間で障害度に差異が指摘されてきた。また、同一民族間においても薬剤性肺障害に対して感受性・抵抗性を示す遺伝的素因の存在が疑われている。そこで、薬剤性肺障害を発症する遺伝学的要因を調べるために文献的考察と既知の報告例を基に、各種遺伝形質と薬剤動態に関わる遺伝子多型を調べた。多くの疾患と相関を示すことが報告されているHLA (Human Leukocyte Antigen)、薬剤代謝酵素 (CYP3A, CYP2C19) および薬物の体内動態に関与するABC(ATP binding cassette)トランスポーターファミリーの一員であるMDR1(multidrug drug resistance)遺伝子多型について解析した。その結果HLAでは、患者群にHLA-A*0206アリル頻度が有意に高く(55.6% vs 0%, $p=0.011$)見られた。代謝酵素であるCYP2C19では636(G/A, exon4)と681(G/A, exon5)の変異に基づいた遺伝子型においてコントロール群で*3アリルの上昇(50% vs 0%, $p=0.033$)が見られた。MDR1遺伝子であるABCB1のプロモーター領域とABCG2の421位(C/A, Q141K)における多型については、両群のアリル頻度で有意差は見られなかった。今回の解析では、試料収集が困難なことから統計学的に確定的な結果と言えないが、HLA-A*0206アリルが肺障害発症に関与していることが示唆された。また、代謝酵素であるCYP2C19の遺伝子多型も薬剤性肺障害発症に影響を及ぼしていることが示唆された。

A. 研究目的

今日、新薬開発により難治疾患・癌疾患治療に次々と新規の薬剤が導入され、その効果が期待されている。これらの薬剤は分子標的薬として、作用点が明確なうえに薬剤効果も優れている一方、

薬剤による副作用例も多く報告されている。その中でも、薬剤性肺障害を示す報告例が海外に比べ日本において増加していることからその発症機序についての検討が必要とされている。本研究では日本人における薬剤性肺障害に如何なる遺伝学的要因が関与しているか検討した。初年度は薬剤性

肺障害を起こした検体収集、遺伝学的要因を解明するためのストラテジーの作成、およびこれまでに報告されている文献的考察を行った。2年目にはGefitinibなどの薬剤により肺障害を発症した患者群9人と無症状のコントロール群10人から得たDNAを用いて、遺伝子多型(HLA, CYP3A5, CYP2C19, ABCB1, ABCG2)を検査し、これらの遺伝的多型性が薬剤性肺障害発症と相関するか検討した。

B. 研究方法

① 解析サンプル

薬剤による肺障害を起こした9例と無症状であっ

た10例について詳細な情報を表1に示した。これらのサンプル血液から自動DNA抽出器(Quick Gene, FUJIFILM Co.)を用いてDNAを得た。

尚、本研究は信州大学医学部倫理委員会、遺伝子解析研究専門委員会にて承認を得ており、使用サンプル使用は提供者からの同意書を得たものである。

② HLA-DNAタイピング

HLA-DNAタイピングは、LABType SSO試薬(One Lambda Inc.)にて、HLA-A*, -B*, -DRB1*, -DQB1*をLuminex法で検査した。

③ 薬物代謝酵素CYP2C19, CYP3A5の遺伝子タイピング

CYP2C19の遺伝子変異は、本来この酵素の基

表1 解析サンプルの詳細

	年齢	性別	病歴	薬剤	
患者群	P1	64	♂	膵臓リウマチ	エンブレル
	P2	63	♂	膵臓リウマチ	リウマトレックス
	P3	77	♂	非小細胞肺癌	ジェムザール, erlotinib
	P4	76	♂	間質性肺炎	?
	P5	77	♂	非小細胞肺癌	ジェムザール
	P6	81	♂	膵臓リウマチ	エンブレル
	P7	63	♂	腫瘍?	ジェムザール
	P8	74	♂	不整脈	ベプコール
	P9	79	♂	非小細胞肺癌	erlotinib
コントロール群	C1	48	♂	非小細胞肺癌	erlotinib
	C2	74	♂	非小細胞肺癌	erlotinib
	C3	43	♂	非小細胞肺癌	erlotinib
	C4	46	♀	非小細胞肺癌	erlotinib
	C5	66	♂	非小細胞肺癌	erlotinib
	C6	58	♀	非小細胞肺癌	erlotinib
	C7	70	♂	非小細胞肺癌	erlotinib
	C8	59	♂	非小細胞肺癌	erlotinib
	C9	85	♂	非小細胞肺癌	erlotinib
	C10	70	♂	非小細胞肺癌	erlotinib

表2 HLA-DNAタイピング結果

Sample Name	A*	B*	DRB1*	DQB1*					
患者群	P1	0206	2402	4002	5401	0405	1501	0401	0302
	P2	0206	2402	1518	3301	0401	0410	0301	0402
	P3	0206	2402	5201	4001	1101	1502	0301	0301
	P4	2402	2601	4402	4801	0405	1301	0401	0303
	P5	0206	3101	5101	5801	0405	1501	0401	0302
	P6	1101	3301	5801	1501	0405	1302	0302	0304
	P7	2402	2601	5201	4002	0301	1501	0302	0303
	P8	1101	3101	5201	5516	0303	1502	0301	0301
	P9	0201	0206	4601	4001	0303	1101	0303	0302
コントロール群	C1	2402	2601	3201	5601	0302	1101	0301	0402
	C2	0301	3101	4001	4402	1301	1202	0301	0303
	C3	2402	2402	4006	5901	0405	0301	0401	0303
	C4	2402	2402	5201	5902	0405	1502	0401	0301
	C5	2402	3301	4403	5201	1302	1502	0304	0301
	C6	1101	2402	3501	6701	1501	0301	0302	0303
	C7	0201	2402	4601	4001	0303	1201	0301	0301
	C8	0201	2402	1501	5201	1405	1502	0301	0301
	C9	1101	3101	4001	4002	0405	0405	0401	0401
	C10	0201	1101	3501	4901	0403	0303	0302	0301

表3 CYP2C19遺伝子エクソン4,5のタイピング結果

	CYP2C19			
	Sample Name	Exon4	Exon5	Genotype
患者群	P1	1/1	1/1	1/1
	P2	1/1	1/1	1/1
	P3	1/1	1/1	1/1
	P4	1/1	1/2	1/2
	P5	1/1	2/2	1/2
	P6	1/1	1/2	1/2
	P7	1/1	1/2	1/2
	P8	1/1	1/2	1/2
	P9	1/1	1/2	1/2
コントロール群	C1	1/1	1/1	1/1
	C2	1/1	2/2	1/2
	C3	1/3	1/2	3/2
	C4	1/1	1/1	1/1
	C5	1/3	1/2	3/2
	C6	1/3	1/1	3/1
	C7	1/1	1/1	1/1
	C8	1/1	1/1	1/1
	C9	1/3	1/2	3/2
	C10	1/3	1/2	3/2

表4 CYP3A5*3,*6のタイピング結果

Sample Name	*3	*6	Type	
患者群	P1	1/3	1/1	1/3
	P2	1/3	1/1	1/3
	P3	1/3	1/1	1/3
	P4	3/3	1/1	3/3
	P5	1/3	1/1	1/3
	P6	1/3	1/1	1/3
	P7	1/3	1/1	1/3
	P8	1/3	1/1	1/3
	P9	3/3	1/1	3/3
コントロール群	C1	1/1	1/1	1/1
	C2	1/1	1/1	1/1
	C3	1/3	1/1	1/3
	C4	3/3	1/1	3/3
	C5	3/3	1/1	3/3
	C6	3/3	1/1	3/3
	C7	3/3	1/1	3/3
	C8	1/1	1/1	1/1
	C9	3/3	1/1	3/3
	C10	1/3	1/1	1/3

表5 ABCB1 ABCG2のSNPsタイピング結果

	ABCB1							ABCG2
	m104662	m212922	m213619	m219594	m172094	m283817	rs223142	
	C67T	G67AT	-129TC	-41AG	-1459A	-1517CG	421CA (OMK)	
患者群	CC	GG	T/T	A/A	GG	T/T	V1	
	CC	GG	T/T	A/A	AG	T/T	V4	
	CC	GG	T/T	A/A	GG	T/T	V1	
	CT	T/A	T/T	A/A	AG	T/T	V4	
	CT	T/A	T/T	A/A	GG	T/T	V1	
	CC	GG	C/T	AG	AG	C/T	24	
	CT	TG	T/T	A/A	AG	T/T	V4	
	CT	GT	T/T	A/A	AG	T/T	V4	
	CT	GG	T/T	A/A	GG	T/T	V1	
コントロール群	CC	GG	T/T	A/A	AA	T/T	44	
	T/T	T/T	T/T	A/A	GG	T/T	V1	
	CC	GA	T/T	A/A	AG	T/T	V4	
	CT	TG	T/T	A/A	GG	T/T	V1	
	T/T	T/T	T/T	A/A	GG	T/T	V1	
	CT	TG	T/T	A/A	AG	T/T	V4	
	CT	T/A	T/T	A/A	GG	T/T	V1	
	CT	T/A	T/T	A/A	GG	T/T	V1	
	T/T	T/T	T/T	A/A	GG	T/T	V1	
CC	GA	GT	AG	GG	GT	V2		

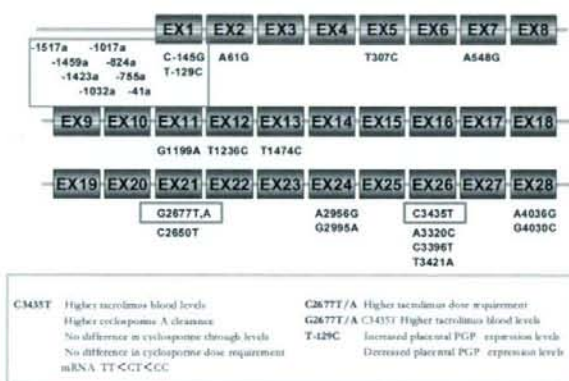


図1 ABCB1遺伝子の構造と主なSNPs

質薬物であるS-メフェトイン(S-Mep)の代謝能に影響を及ぼす重要な変異であるCYP2C19*3 (G636A, exon4)とCYP2C*2 (G681A, exon5)についてPCR-RFLP(restriction fragment length polymorphism)法を用いて行った¹⁾。

CYP3A5遺伝子多型については、この酵素蛋白の欠損の原因であるCYP3A5*3 (A6986G, intron4)とCYP3A5*6(G14690A, exon7)をPCR-RFLP法にて検査した²⁾。

- ④ 薬物排出に関与するABCトランスポーター MDR1遺伝子多型(図1)は、ABCB1遺伝子プロモーター領域内にある4種類のSNPs (-1459G>A, -1517T>C, -129T>C, -41A>G)

とエクソン内にある2種類のSNPs(G2677AT, exon21, C3535T, exon26)、およびABCG2遺伝子421C>AをTaqMan SNP genotyping assay kit (AB1)を用いてTaqMan Real Time PCRで判定した。

C. 研究結果と考察

① HLAタイピング

薬剤性肺障害発症を患者群、非発症をコントロール群におけるHLAアレル判定結果を表2に示した。各群のアレル保有率を dominant modelにて χ^2 検定を行うと、HLA-A*0206アレルが統計学的有意に増加していた(55.6% vs 0%, p=0.011, Fisherの補正)。他のアレルに有意差は認められなかった。HLA-A*0206は、HLA-A*02のサブタイプであり、日本人におけるアレル頻度は8.99%である。最も高頻度に見られるサブタイプはA*0201で10.71%を示す。今回の解析はサンプル数が少ないが、患者群におけるA*0206アレル頻度は27.78%で一般健常日本人のアレル頻度と比べても有意に高い値(p=0.021 Yatesの補正)を示している。

HLAと薬剤感受性に関しては、tiopronin(肝機能改善薬)やticlopidine(抗血小板剤)による肝障害とHLA-A*3303との相関が報告されている^{3,4)}。また、アメリカFDAの報告(2007年12月14日)によるとcarbamazepine(てんかん治療薬)の服用により、Stevens-Johnson症候群を引き起こす遺伝的要因としてHLA-B*15025)の関与を示している。この薬剤副作用の危険率は民族的相違が見られ、白人では1~6人/10,000人で、アジア人では10~60人/10,000人である。今回の薬剤性肺障害を発症する患者群にはA*02のサブタイプであるA*0201でなくA*0206アレルが多く見られたのは、

HLAアレルの構造的相違が薬剤との関わりに寄与している可能性も考えられる。因みにA*0201とA*0206はHLA分子の中で、一個所9番目のアミノ酸がPhenylalanineとTyrosineで異なっている。

② 薬物代謝酵素CYP2C19, CYP3A5の遺伝子タイプング

CYP2C19遺伝子は、染色体上10q24にあり、9つのエクソンから構成されている。この遺伝子のなかには多くのSNPsが報告されているが、そのなかでもエクソン4の636位のguanineからadenineの変異CYP2C19*3(G636A)とエクソン5の681位にあるguanineからadenineの変異CYP2C*2(G681A)は、stop codonとsplicing defectを生じ、mutant型*3/*3, *2/*2, *2/*3型では酵素欠損者となる。今回、コントロール群では、エクソン4にmutant(*3アレル:adenine)が多かった(50% vs 0%, $p=0.033$)。また、コントロール群では酵素欠損者が4人見られたが、患者群では0人であった。因みに日本人では、約23%が酵素欠損者である。酵素非欠損者は、薬剤の代謝能が高いことから、薬剤の血中濃度が高度となると推測される。患者群が総て酵素非欠損者であるのと、薬剤性肺障害の発症には何らかの関連性が示唆された。

CYP3A5遺伝子は7番染色体上の存在するCY3Aのサブファミリーで、肝臓に発現している。この遺伝子の一塩基変異によりスプライシング異常を起こし、酵素蛋白の欠損を招く多型CYP3A5*3(A6986G, intron4)とCYP3A5*6(G14690A, exon7)について調べた結果を表4に示す。CYP3A5はGがmutantでアレル*3を示し、*1がwild typeである。また、*6はwild typeを示す。CYP3A5が、*3/*3の人は酵素欠損者であり、CYP3A分子の発現が見られず、ある種の薬剤は代謝されにくいと考えられる。それに対して、*1アレル保有者は、CYP3Aにより代謝された薬剤のクリアランスが

高く、薬剤による毒性から逃れられる可能性が高いと考えられる。尚、一般日本人では*3/*3は60%、*6/*6は0%と報告されている²⁾。今回の解析結果をみると、*3/*3はコントロール群で5人見られたのに対し、患者群では2人であった。

③ ABCトランスポーターMDR1遺伝子タイプング

プロモーター領域内にある4種類のSNPs(-1459G>A, -1517T>C, -129T>C, -41A>G)とエクソン内にある2種類のSNPs(G2677AT, exon21, C3535T, exon26)および、ABCG2遺伝子421C>Aのタイプング結果を表4に示す。薬物輸送に関与するABCトランスポーターABCB1とABCG2は最近、薬剤性障害と関連することが報告されている。ABCB1多型はDocetaxel(ドセタキセル)によるアンドロジェン非依存性前立腺癌患者への薬剤障害⁶⁾が、ABCG2多型はGefitinib(ゲフィチニブ)経口投与による下痢障害と⁷⁾を引き起こすとの報告がある。

本解析では、両群においてABCB1, ABCG2遺伝子多型において肺障害発症との相関は認められなかった。

今回、HLA、一部の薬物代謝酵素、薬物トランスポーターの遺伝子多型と薬剤性肺障害発症との関連を調べ、統計学的有意差を示す遺伝要因が認められた。しかし、解析のサンプル数の少なさと診断基準の規格に曖昧さから、この統計解析が検出力、効果量で十分な威力を発揮しているかは疑問である。今後、更に検体数を増やして解析をする必要があると考える。

D. 結 論

今回のサンプル解析数は少数であったが、薬剤性肺障害発症者とHLAや薬物代謝酵素(CYP2C19)の遺伝子多型とに相関が見られた。今後更に解析

結果の信憑性を高めるためにもサンプルを増やす必要がある。また、薬剤剤性肺障害に関する遺伝子と機能異常を推測するために、肺組織検体を用いたマイクロアレイ解析、トランスクリプトーム解析が必要である。

E. 参考文献

1. Kimura M, et al. Genetic polymorphisms of cytochrome P450, CYP2C19, and CYP2C9 in a Japanese population. *Ther. Drug. Monit.* 20: 243-247, 1998.
2. Fukuen S, et al. Novel detection assay by PCR-RFLP and frequency of the CYP3A5 SNPs, CYP3A5*3 and *6, in a Japanese population. *Pharmacogenetics* 12:331-334, 2002.
3. Kurosaki M, et al. HLA-A33/B44/DR6 is highly related to intrahepatic cholestasis induced by tiopronin. *Dig. Dis. Sci.* 45:1103-1108, 2000.
4. Hirata K, et al. Ticlopidine-induced hepato toxicity is associated with specific human leukocyte antigen genomic subtypes in Japanese patients: a preliminary case-control study. *Pharmacogenomics J.* 8:29-33, 2008.
5. Chung WH, et al. Medical genetics: a marker for Stevens-Johnson syndrome. *Nature* 428: 486, 2004.
6. Sissung TM et al. ABCB1 genetic variation influences the toxicity and clinical outcome of patients with Androgen-independent prostate cancer treated with Docetaxel. *Clin. Cancer Res.* 14:4543-4549, 2008.
7. Cusatis G, et al. Pharmacogenetics of ABCG2 and adverse reactions to Gefitinib. *J. Natl.*

Cancer Inst. 98:1739-1742, 2006.

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Hanaoka M, Droma Y, Ota M, Ito M, Katsuyama Y, Kubo K. Polymorphisms of human vascular endothelial growth factor gene in high-altitude pulmonary oedema susceptible subjects. *Respirology* 14:46-52, 2009.
- 2) Droma Y, Ota M, Hanaoka M, Katsuyama Y, Basnyat B, Neupane P, Ariyal A, Pandit A, Shama D, Ito M, Kubo K. Two hypoxia sensor genes and their association with symptoms of acute mountain sickness in Sherpas. *Aviat Space Environ Med.* 79: 1056-1060, 2008.
- 3) Ito M, Hanaoka M, Droma Y, Hatayama O, Sato E, Katsuyama Y, Fujimoto K, Ota M. The Association of Transforming Growth Factor Beta 1 Gene Polymorphisms with the Emphysema Phenotype of COPD in Japanese. *Intern Med.* 47:1387-9134, 2008.
- 4) Droma Y, Hanaoka M, Basnyat B, Arjyal A, Neupane P, Pandit A, Sharma D, Ito M, Miwa N, Katsuyama Y, Ota M, Kubo K. Adaptation to high altitude in sherpas: association with the insertion/deletion polymorphism in the Angiotensin-converting enzyme gene. *Wilderness Environ Med.* 19: 22-29, 2008.
- 5) Hanaoka M, Yu X, Urushihata K, Ota M, Fujimoto K, Kubo K. Leptin and Leptin Receptor Gene Polymorphisms in Obstructive Sleep Apnea Syndrome. *Chest.* 133:79-85.

2008.

2. 学会発表

- 1) Ito M, Hanaoka M, Droma Y, Yasuo M, Tanabe T, Komatsu Y, Katsuyama Y, Fujimoto K, Kubo K, Ota M. Toll like receptor 4 gene polymorphisms and COPD in Japanese population. 2008 American Thoracic Society International Conference, May 16-21, 2008, Toronto, Canada
- 2) 雲登卓瑪、花岡正幸、Buddha Basnyat、伊東理子、太田正穂、久保恵嗣、小林俊夫：シェルバ族の高地適応における分子遺伝学的検討。2008年度日本登山医学会学術集会・第28回日本登山医学シンポジウム、2008年5月31日～6月1日、富山
- 3) Ito M, Hanaoka M, Droma Y, Hatayama O, Fujimoto K, Kubo K, Katsuyama Y, Ota M. Association of Transforming Growth Factor- β 1 (TGFB1) Gene Polymorphisms with COPD and Emphysema. 2007 American Thoracic Society International Conference, May 18-23, 2007, San Francisco, USA
- 4) 雲登卓瑪、花岡正幸、伊東理子、太田正穂、久保恵嗣、小林俊夫：シェルバ族の高地適応における内皮型一酸化窒素合成酵素遺伝子の関与。2007年度日本登山医学会学術集会・第27回日本登山医学シンポジウム、2007年6月2日～3日、宮城
- 5) 伊東理子、花岡正幸、小松佳道、藤本圭作、久保恵嗣、太田正穂、肺気腫の発症要因と Transforming growth factor beta1 遺伝子多型。第47回日本呼吸器学会、2007年5月10～12日、東京